

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501021

研究課題名（和文） 新規 p53 標的遺伝子 Mieap のミトコンドリアを標的とした腫瘍抑制機序の解明

研究課題名（英文） Potential role of Mieap, a p53-inducible protein, in tumor suppression and mitochondrial quality control

## 研究代表者

中村 康之（NAKAMURA YASUYUKI）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90569063

## 研究成果の概要（和文）：

p53 誘導性タンパク質である Mieap は、不良ミトコンドリア内にリソソームを誘導して、酸化タンパク質を除去して修復するか（MALM）、液胞様構造物を誘導して、不良なミトコンドリアを分解して排除するか（MIV）、いずれかの機能によってミトコンドリアの品質を健常に維持している。ヒトがん細胞においては、これらの機能が高頻度に不活性化されており、結果として不良なミトコンドリアが蓄積し、そこから産生される活性酸素種が、がんの発生・増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria via MALM (the Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria: the elimination of oxidized mitochondrial proteins) or MIV (Mieap-induced vacuole: the degradation of unhealthy mitochondria). In human cancer cells, the function is frequently inactivated, leading to the accumulation of unhealthy mitochondria and increase of reactive oxygen species (ROS) production by the mitochondria. The mitochondrial ROS may play a critical role in cancer initiation, progression, invasion and metastasis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：腫瘍抑制、p53、ROS、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの重要な役割は、細胞生存に必要なエネルギー源である ATP の産生と、細胞死に重要なアポトーシスの誘導である。ミトコンドリアの ATP 産生は、酸化的リン酸化という複雑な過程から成り、その過程で活性酸素種（ROS）が産生される。ミトコンド

リアからの ROS は、細胞内のタンパク質、脂質、DNA に酸化ダメージを与え、老化やがん・神経変性疾患などの様々な疾患の原因になる。一方、ミトコンドリアは、シトクロム c を放出することで、アポトーシス経路において中心的役割を果たす。多細胞生物の体内では、細胞が常のがん化の危険にさらされてい

るにもかかわらず、前がん状態の細胞は、アポトーシスによって取り除かれているため、がん化が未然に防がれている。従ってアポトーシスの破綻は、がん化の原因となる。このようにミトコンドリアには、細胞に対して生と死という二つの役割を持っている。

がん細胞は増殖が盛んであるにもかかわらず、ミトコンドリア機能は低下している。実際がん細胞のミトコンドリアからは ROS が過剰産生され、ミトコンドリア DNA には多くの変異が認められる。ミトコンドリアの酸化リン酸化反応に関わるタンパク質は、過剰な ROS により酸化され、ATP 産生能が著しく低下していることから、がん細胞は ATP 産生を酸化リン酸化より効率の劣る解糖系に依存している (Warburg 効果)。また、がん細胞からの高いレベルの ROS は、NF- $\kappa$ B や HIF1 $\alpha$  を介した細胞増殖シグナル、血管新生あるいは、がん浸潤転移を促進することによって、がんの進展に深く関係している。従って、がん細胞は不良なミトコンドリアを積極的に増やすことで、正常細胞と比べて、高レベルの ROS を維持し、利用しているとも言える。しかし、一定レベル以上の大過剰の ROS が発生すると、がん細胞に細胞死が誘導される。故に、がん細胞は、一方でミトコンドリアからの高いレベルの ROS を利用しながら、そのレベルをある一定の範囲に制御する必要があると考えられる。

以上のことから、ミトコンドリアの品質管理機構は、がん細胞への不良なミトコンドリアの蓄積と、そこから産生される ROS レベルの上昇に密接に関連しており、新しいがん抑制のメカニズム解明につながると共に、がん予防・診断・治療戦略に大きく貢献しうる可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々が発見した新規 p53 誘導性タンパク質 Mieap によるミトコンドリア品質管理機構のメカニズムの詳細を明らかにする。また、がん細胞において、この機能がどのような役割を果たしているのかを明らかにする。これらの成果により、全く新しいがん抑制機能の全貌を明らかにして、がんの予防・診断・治療に関する新しい戦略開発の基盤を作る。

## 3. 研究の方法

(1) 多くのがん細胞株で、Mieap の発現低下を認めた。その原因を調べるために、Mieap プロモーターのメチル化状態を Methylation specific PCR (MSP) および Bisulphite sequencing analysis により解析した。(2) Mieap 依存的に誘導されるミトコンドリア内へのリソソームタンパク質の集積 (MALM) を蛍光免疫染色、免疫電顕、プロテインアーゼ K を用いた生化学的手法により解析した。

(3) MALM 誘導時のミトコンドリア超微細構造を電子顕微鏡により解析した。(4) 不良ミトコンドリア状況を、酸化タンパク質に対するウェスタンブロッティングと蛍光免疫染色により解析した。(5) ミトコンドリアから生成される ROS レベルを、MitoSOX Red で調べた。(6) ミトコンドリアの ATP 合成能をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応により測定した。(7) Mieap 結合タンパク質を Mieap に対する免疫沈降法により同定した。(8) Mieap の過剰発現で誘導される液胞構造物 (MIV) に関して、Mieap とリソソームタンパク質の局在を蛍光免疫染色により解析した。

## 4. 研究成果

(1) がん細胞株の多くで Mieap 発現が不活性化しており、その原因が Mieap プロモーターのメチル化であることを見出した。(2) 様々なミトコンドリア傷害ストレスにตอบสนองして、Mieap 及びリソソームタンパク質 (リソソーム膜タンパク質 LAMP1、LAMP2、リソソーム酵素 Cathepsin B、Cathepsin D) がミトコンドリア内部に検出された。(3) 電子顕微鏡解析において、オートファゴソームやミトコンドリアの構造破壊は認められなかった。免疫電子顕微鏡解析で、Mieap 及びリソソームタンパク質 (リソソーム膜タンパク質 LAMP1、LAMP2、リソソーム酵素 Cathepsin B、Cathepsin D) がミトコンドリア内部に検出された。(4) MALM 非誘導細胞においては、ミトコンドリアを主体とした酸化修飾タンパク質が蓄積していた。(5) MALM 非誘導細胞においては、ミトコンドリアからの ROS 産生が増加していた。(6) MALM 非誘導細胞においては、ミトコンドリアからの ATP 産生活性が減少していた。(7) Mieap 結合タンパク質として、ミトコンドリア外膜タンパク質、NIX を同定した。NIX は MALM 誘導に極めて重要な役割を果たしている事が明らかとなった。(8) 蛍光免疫染色法により、Mieap は MIV の辺縁に局在していた。MIV は過剰な ROS を産生する不良なミトコンドリアを取り込んで分解した。

以上の結果から、我々の見いだした Mieap によるミトコンドリア品質管理機構は、従来からよく知られたオートファジーとは全く異なる、新しい細胞機能である可能性が示唆された。また、Mieap は、ミトコンドリア内の酸化修飾タンパク質を分解除去する不良ミトコンドリアの修復機能 (MALM) と、ミトコンドリアそのものを分解除去する排除機能 (MIV) の二つの機能によって、ミトコンドリアの品質を維持し、ミトコンドリア機能の恒常性を保っていると考えられた。この機能によって、結果的にミトコンドリアからの良好な ATP 産生が可能となり、発生する ROS

を低下させることができると考えられる。がん細胞においては、Mieap のプロモーターが高頻度にメチル化によって不活性化されており、p53 変異と合わせると、ほぼすべてのがんがこの機能が失われている可能性がある。結果として、がん細胞には不良なミトコンドリアが蓄積する運命にあり、これまで長年不明であった Warburg 効果の理由を説明しうる成果と考えられる。また、不良なミトコンドリアから産生される ROS が、がんの発生・増殖・浸潤・転移に大きく貢献している可能性があり、今後の臨床がんを含めた解析が必要と思われる。また、がん細胞におけるミトコンドリア品質管理機構の不活性化と、その結果としてがんに特異的に集積する不良なミトコンドリア、及びそこから産生される ROS は、がんの予防・診断・治療法開発のための新しい標的となると期待され、その意味でもこの後の研究を進めていく意味が大きい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

英文原著 (査読あり)

1. Identification of 14-3-3  $\gamma$  as a Mieap-interacting protein and its role in mitochondrial quality control.

Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, Nakamura Y, Yoshida M, Kamino H, Murai R, Yamada T, Arakawa H.

Sci Rep. 2012;2:379.

doi: 10.1038

2. BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria.

Nakamura Y, Kitamura N, Shinogi D, Yoshida M, Goda O, Murai R, Kamino H, Arakawa H.

PLoS One. 2012;7(1):e30767.

doi: 10.1371

3. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria.

Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, Miyamoto T, Kabu K, Yoshida M, Futamura M, Ichinose S, Arakawa H.

PLoS One. 2011 Jan 17;6(1):e16060.

doi: 10.1371

4. Possible existence of lysosome-like organella within mitochondria and its role in mitochondrial quality control.

Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Futamura M, Miyamoto T, Yoshida M, Ono M, Ichinose S, Arakawa H.

PLoS One. 2011 Jan 17; 6(1):e16054.

doi: 10.1371

[学会発表] (計 23 件)

1. 加美野宏樹、中村康之、他「大腸がんでみられる Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の破綻とその意義について」平成 24 年 12 月 19 日 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 (つくば市)

2. 佐野仁哉、中村康之、他「Analysis of the p53/Mieap/BNIP3 mitochondrial quality control pathway in esophageal and gastric cancer」平成 24 年 12 月 19 日 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 (つくば市)

3. 吉田将紀、中村康之、他「低酸素ストレスはリソソームタンパク質のミトコンドリア内集積を誘導する」平成 24 年 12 月 19 日 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 (つくば市)

4. 中村康之、他「Mieap 結合タンパク質としての 14-3-3  $\gamma$  の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」平成 24 年 12 月 19 日 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 (つくば市)

5. 村井竜也、中村康之、他「ミトコンドリア由来活性酸素種のがん治療標的としての意義」平成 24 年 12 月 20 日 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 (つくば市)

6. 齋藤有理、中村康之、他「Mieap 誘導性液胞様構造物の形成における UVRAG との結合を介した Mieap- $\alpha$  の役割について」平成 24 年 12 月 20 日 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 (つくば市)

7. 中村康之、他「Mieap 結合タンパク質としての 14-3-3  $\gamma$  の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」平成 24 年 12 月 11 日 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡市)

8. 加美野宏樹、中村康之、他「大腸がんで高頻度に生じる Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の不活性化」平成 24 年 12 月 11 日 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡市)

9. 齋藤有理、中村康之、他「Mieap 誘導性液胞様構造物の形成における UVRAG との結合を介した Mieap- $\alpha$  の役割について」平成 24 年 12 月 11 日 第 35 回日本分子生物学会年会

(福岡市)

10. 吉田将紀、中村康之、他「低酸素ストレスはリソソームタンパク質のミトコンドリア内集積を誘導する」平成 24 年 12 月 12 日 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡市)

11. Yasuyuki Nakamura, et al. 「Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria」平成 24 年 10 月 29 日 The 6th International Symposium on Autophagy 2012 (名護市)

12. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, et al. 「Mieap controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」平成 24 年 10 月 29 日 The 6th International Symposium on Autophagy 2012 (名護市)

13. 村井竜也、中村康之、他「ミトコンドリア由来活性酸素種のがん治療標的としての意義」平成 24 年 9 月 19 日 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)

14. 齋藤有理、中村康之、他「Mieap が誘導する液胞様構造物の形成において UVRAG と結合して働く Mieap- $\alpha$  の特異的な役割」平成 24 年 9 月 19 日 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)

15. 佐野仁哉、中村康之、他「食道がん及び胃がんにおけるミトコンドリア品質管理に関わる p53/Mieap/BNIP3 経路の解析」平成 24 年 9 月 19 日 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)

16. 吉田将紀、中村康之、他「低酸素環境下におけるミトコンドリア品質管理機構を介した Mieap の腫瘍抑制作用について」平成 24 年 9 月 20 日 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)

17. 加美野宏樹、中村康之、他「大腸がんで高頻度に生じる Mieap によるミトコンドリア品質管理機構の破綻について」平成 24 年 9 月 20 日 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)

18. 中村康之、他「Mieap 結合タンパク質としての 14-3-3 $\gamma$  の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」平成 24 年 9 月 20 日 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)

19. 中村康之、他「Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality

by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」平成 23 年 12 月 14 日 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜市)

20. 喜多村憲章、中村康之、他「Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control」平成 23 年 12 月 15 日 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜市)

21. 吉田将紀、中村康之、他「BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria」平成 23 年 12 月 15 日 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜市)

22. 吉田将紀、中村康之、他「リソソーム様オルガネラがミトコンドリア内に存在する可能性とミトコンドリア品質管理におけるその役割について」平成 23 年 10 月 4 日 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市)

23. 中村康之、他「修復と排除：p53 誘導性タンパク質 Mieap による新規ミトコンドリア品質管理機構」平成 23 年 10 月 3 日 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 康之 (NAKAMURA YASUYUKI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90569063